

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANA CARVALHO WIBBELT

**PREVENÇÃO DA AUTO-OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA PELOS FLAVONÓIDES
QUERCETINA E RUTINA**

CURITIBA

2011

TATIANA CARVALHO WIBBELT

**PREVENÇÃO DA AUTO-OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA PELOS FLAVONÓIDES
QUERCETINA E RUTINA**

Artigo apresentado como requisito para obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. MsC. Railson Henneberg

CURITIBA

2011

RESUMO

O eritrócito passa por uma série de alterações metabólicas durante o seu envelhecimento que resulta na formação da metahemoglobina e diminuição da capacidade de transporte de oxigênio. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito *in vitro* da quercetina e da rutina, sobre o metabolismo oxidativo de eritrócitos normais em processo de envelhecimento natural, através da determinação da metahemoglobina. Após a incubação com concentrações de quercetina (100 e 200 μ moles/l) e rutina (100 μ moles/l), foram determinadas as concentrações de metahemoglobina no tempo zero, 3, 7 e 14 dias após a coleta de sangue de pacientes saudáveis, sem histórico de cianose. A quercetina e a rutina apresentaram um efeito protetor nas concentrações testadas ($p < 0,05$) a partir do sétimo dia de incubação. Estes dados comprovam a atividade antioxidante destes compostos polifenólicos *in vitro*, porém, estudos *in vivo* são necessários para comprovar a real aplicabilidade clínica dos dados obtidos no presente trabalho.

Palavras-chave: eritrócito, metabolismo oxidativo, metahemoglobina, quercetina, rutina.

ABSTRACT

The erythrocyte has a lot of metabolic changes in its aging process, that makes the cell lose the ability to transport oxygen, and methemoglobin is the greatest example of this process. This research aims to evaluate the *in vitro* effect of quercetin and rutin on the oxidative metabolism of normal erythrocytes in the natural aging process, through the determination of methemoglobin. After incubation with concentrations of quercetin (100 and 200 $\mu\text{mol/l}$ and rutin (100 $\mu\text{mol/l}$), methemoglobin concentrations were determined at time zero, 3, 7 and 14 days after blood collection from healthy patients without history of cyanosis. Quercetin and rutin showed a protective effect at the tested concentrations ($p < 0.05$) from the seventh day of incubation. These results confirm the antioxidant activity of polyphenolic compounds *in vitro*, however, *in vivo* studies are necessary to demonstrate the real applicability of clinical results obtained in this work.

Key-words: erythrocyte, oxidative metabolism, methemoglobin, quercetin, rutin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura geral dos Flavonóides.	11
FIGURA 2 – Estrutura química da quercetina	12
FIGURA 3 – Estrutura química da rutina.	12
FIGURA 4 – Comportamento da metahemoglobina em função do tempo e da presença dos flavonóides quercetina e rutina.	15
FIGURA 5 – Comportamento da metahemoglobina em função do tempo e da presença da quercetina e da rutina em diferentes concentrações.	16

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores de metahemoglobina em eritrócitos sem tratamento (ST) e com a ação da quercetina e da rutina.....	15
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3 RESULTADOS	15
4 DISCUSSÃO	17
REFERÊNCIAS.....	20

1 INTRODUÇÃO

O organismo humano é alvo constante da ação de radicais livres, que são formados no metabolismo celular normal, levando ao dano oxidativo na maioria das células (SANTOS, 2008; MACHADO, *et al*, 2009). Por possuir grande quantidade de ácidos graxos livres poliinsaturados na sua membrana, alta concentração de oxigênio devido a sua função de transporte, a presença do ferro, o eritrócito se torna altamente susceptível ao estresse oxidativo (DALPINO, 1998; MACHADO, *et al*, 2009; MAGALHÃES, 2009).

O eritrócito é dotado de um elaborado sistema de defesa antioxidante que atua removendo radicais livres, como a vitamina E e as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona peroxidase (GSH-Px), além de possuir mecanismos de reparo da oxidação por “reciclagem” dos antioxidantes, através da vitamina C, e de enzimas como glutathiona redutase (GSH-Rd) e metahemoglobina redutase (DALPINO, 2008; SANTOS, 2008; MACHADO, *et al*, 2009) que tem a função de manter a célula no seu estado reduzido, promovendo a integridade funcional e estrutural das macromoléculas biologicamente fundamentais à célula (CHAVES, 2007). Quando o sistema de defesa antioxidante, que é dependente da via glicolítica, não consegue combater os radicais livres formados, temos o estresse oxidativo (KRUKOSKI, 2006).

À medida que o eritrócito se aproxima dos 120 dias de vida, observa-se uma redução na sua atividade enzimática comprometendo todos os processos energéticos, assim como diminui também a produção das enzimas do sistema de defesa antioxidante do eritrócito, afetando vários dos seus componentes, principalmente a hemoglobina, que vai ser oxidada (MARTINS, 1995).

Quando a hemoglobina, que contém o ferro do grupo heme no estado ferroso (2+) é oxidada, este ferro passa ao estado férrico (3+) caracterizando a metahemoglobina, que não se liga ao oxigênio e também prejudica a liberação de oxigênio nos tecidos por desviar a curva de dissociação da hemoglobina parcialmente oxidada para a esquerda (NASCIMENTO, *et al*, 2008)

A quantidade de metahemoglobina normalmente formada é menor que 1% porque ela é rapidamente reduzida à hemoglobina por um sistema redutor catalisado pela NADH desidrogenase, para não comprometer o transporte de oxigênio

(AGUILAR-DA-SILVA, 2003; SANTOS, 2008). Com o processo natural de envelhecimento do eritrócito, a concentração de metahemoglobina aumenta progressivamente devido à deficiência nos sistemas enzimáticos de proteção da célula (MARTINS, 1995).

A doença metahemoglobinemia resulta do desequilíbrio redox, quer pela oxidação excessiva de hemoglobina (aumento na produção) ou diminuição da atividade das enzimas redutoras (redução do metabolismo). (NASCIMENTO, *et al*, 2008)

A metahemoglobinemia pode ser adquirida (aguda) ou congênita, em que os casos adquiridos se apresentam mais freqüentes que os de origem congênita. A forma adquirida pode ocorrer em: 1) adultos após contato com grande quantidade de uma substância oxidante surgindo eventualmente em condições patológicas, como sepse, crise falcêmica, infecções gastrointestinais, tratamento com inúmeros fármacos, pesticida e substâncias químicas industriais. Os agentes oxidantes aceleram a oxidação da hemoglobina de 100 a 1000 vezes sobrepondo-se à capacidade dos sistemas redutores endógenos; 2) crianças com idade inferior a 3 meses em que não há completo desenvolvimento da capacidade de redução de metahemoglobina das hemácias; além da hemoglobina fetal ser mais facilmente oxidada a HbA. Soma-se ainda o pH intestinal elevado que facilita o crescimento de bactérias gram-negativas conversoras de nitratos alimentares em nitritos, com maior poder oxidante. (NASCIMENTO, *et al*, 2008)

A forma hereditária da metahemoglobinemia pode ser resultante de: 1) homozigose para um gene anormal da NADH desidrogenase; 2) Hemoglobinas M, pois os diferentes tipos de hemoglobinas variantes apresentam tendência à oxidação espontânea, com conseqüente cianose (NASCIMENTO, *et al*, 2008). Nessa condição, a hemoglobina sofre mutações na cadeia de globina, com estabilização o ferro do radical heme no estado oxidado. Em geral, há substituição de histidina por tirosina na cadeia alfa ou beta. Os portadores de HbM são cianóticos, mas geralmente assintomáticos. A expectativa de vida não é afetada e a doença é herdada com um padrão autossômico dominante. Acredita-se que a homozigose seja incompatível com a vida. (NAOUM, 2004)

Os mecanismos de defesa contra a lesão oxidativa podem ser reforçados com a introdução de antioxidantes da dieta. Os alimentos, principalmente frutas, verduras, legumes, contêm agentes antioxidantes como os flavonóides, que são

capazes de impedir a propagação das reações induzidas pelos radicais livres (MAGALHÃES, 2009; PEREIRA, 2009).

A classificação dos flavonóides baseia-se na sua estrutura química, dividindo-os em vários grupos (CAI, 1997). São compostos de baixo peso molecular, que compartilham um esqueleto comum difenólico, composto de dois anéis fenólicos (A e B) ligados através de um anel heterocíclico (C). Os carbonos dos anéis A e C são numerados de 2 a 8, enquanto que no anel B, são numerados de 2 a 6 (Figura 1). Esta estrutura básica permite vários padrões de substituições e variações, principalmente no anel C (MARTINEZ-FLOREZ, 2002).

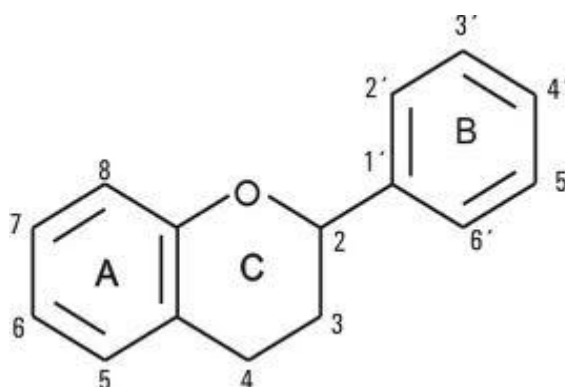


FIGURA 1 – Estrutura geral dos Flavonóides.

A capacidade antioxidante dos flavonóides é determinada basicamente pela sua estrutura, principalmente por substituintes hidroxilas (CERQUEIRA, 2007). A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiavona) é um dos flavonóides mais facilmente encontrados nas plantas. A estrutura química deste composto garante os principais requisitos para uma eficiente atividade quelante e seqüestradora de elétrons (LOPEZ-REVUELTA, 2006). Em vários estudos sobre a quercetina, tem-se demonstrado um efeito inibitório no crescimento de linhagens celulares de vários tipos de câncer com diferentes origens como: colo, ovário, trato gastrointestinal, mama e em leucemias. Este flavonóide parece ter atividade inibidora da enzima tirosina quinase, o que poderia evidenciar sua ação antitumoral (CAI, 1997). A alta atividade antioxidante da quercetina se deve à habilidade de impedir os processos

radicais nas células por alguns mecanismos já bem descritos: (1) pela sua ação seqüestradora de O_2^- (HU, *et al*, 1995); (2) pela reação com radicais peroxil, inibindo assim a peroxidação lipídica (JOVANOVIĆ, *et al*, 1994) e (3) pela ação quelante de ferro, diminuindo a formação de radicais hidroxila (MOREL, *et al*, 1993).

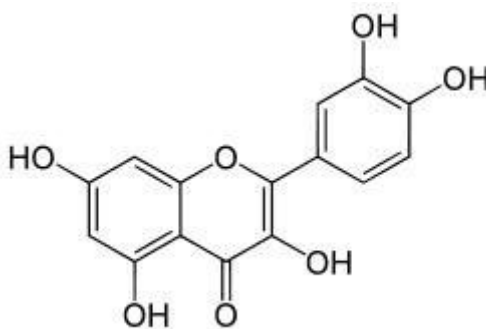


FIGURA 2 – Estrutura química da quercetina

Outro flavonóide importante é a rutina, que difere da quercetina por possuir uma molécula de açúcar (rutinose) na posição 3 do anel C. Por este motivo, algumas vezes recebe o nome de rutinosídeo de quercetina. A presença da rutinose confere à molécula uma característica hidrofílica, atrapalhando assim sua interação com as membranas celulares (FERRALI, *et al*, 1997). Sua atividade antioxidante se deve ao fato de poder atuar como seqüestradora de O_2^- e quelante de ferro (GRINBERG, 1994).

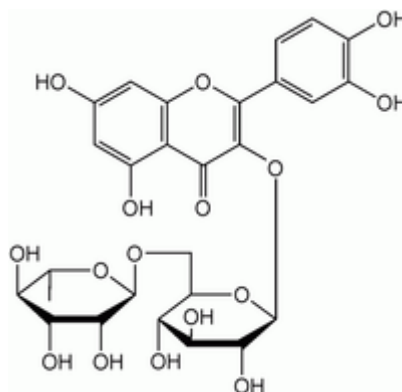


FIGURA 3 – Estrutura química da rutina.

O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito *in vitro* da quercetina e da rutina na prevenção do estresse oxidativo resultante do envelhecimento natural da célula, através da dosagem da metahemoglobina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sangue utilizadas neste trabalho foram coletadas de crianças que participam do Projeto de Extensão “Incidência de parasitoses e anemias em crianças com idade escolar na Escola Municipal Ayrton Senna – Cidade de Curitiba – PR” com registro na Pró-Reitoria de Extensão e Cultura (PROEC) da Universidade Federal do Paraná, sob o registro 472/08. As coletas foram realizadas após a assinatura pelos pais ou pelos responsáveis legais, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram coletadas 8 amostras de sangue com anticoagulante EDTA K₃ para a dosagem espectrofotométrica da metahemoglobina. Todas as amostras incluídas neste estudo apresentaram hemograma normal e nenhum histórico clínico de cianose. Foram preparadas suspensões de eritrócitos a 40%, separadas em alíquotas de 1 mL em microtubos Eppendorf, a partir de eritrócitos lavados por três vezes em tampão PBS pH 7,4 gelado. Após centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos, 200 µl do sobrenadante foram retirados, para a adição de 200 µl de solução estoque de quercetina e rutina, obtendo as concentrações finais de cada flavonóide em 100 µmoles/l e 200 µmoles/l. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente, sob proteção da luz, e as determinações da metahemoglobina foram realizadas no dia da coleta da amostra (tempo 0), três, sete e quatorze dias após.

A técnica proposta para a dosagem de metahemoglobina, em valores percentuais, é fundamentada na avaliação de solução previamente estabilizada em tampão fosfato 60 mmol/L, em dois comprimentos de onda específicos para metahemoglobina (630 nm) e oxihemoglobina (540 nm), após hemólise com saponina a 1% (NAOUM, 2004). As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro CINTRA 10. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Os valores médios de metahemoglobina determinados nos dias zero, três, sete e quatorze após a coleta estão demonstrados na tabela 1. A partir do sétimo dia, os valores encontrados demonstraram diferenças estatisticamente significativa entre as dosagens sem tratamento e com tratamento. As figuras 3 e 4 demonstram o comportamento da metahemoglobina em função do tempo e das concentrações dos flavonóides.

Dias	ST	Quercetina 100 μ moles/l	Quercetina 200 μ moles/l	Rutina 200 μ moles/l
0	3.33 \pm 0.09			
3	4.08 \pm 0.18	4.12 \pm 0.44	4.20 \pm 0.21	4.08 \pm 0.16
7	4.94 \pm 0.19	4.41 \pm 0.21	4.60 \pm 0.37	4.52 \pm 0.36
14	6.38 \pm 0.42	5.31 \pm 0.48	5.18 \pm 0.48	5.35 \pm 0.51

TABELA 1 – Valores de metahemoglobina em eritrócitos sem tratamento (ST) e sob a ação da quercetina e da rutina.

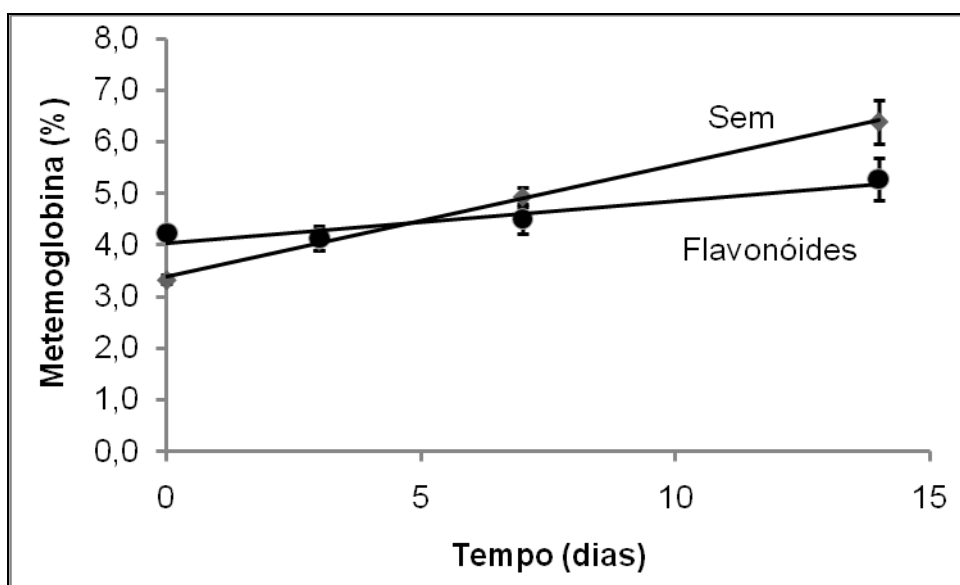


FIGURA 4 – Comportamento da metahemoglobina em função do tempo e da presença dos flavonóides quercetina e rutina.

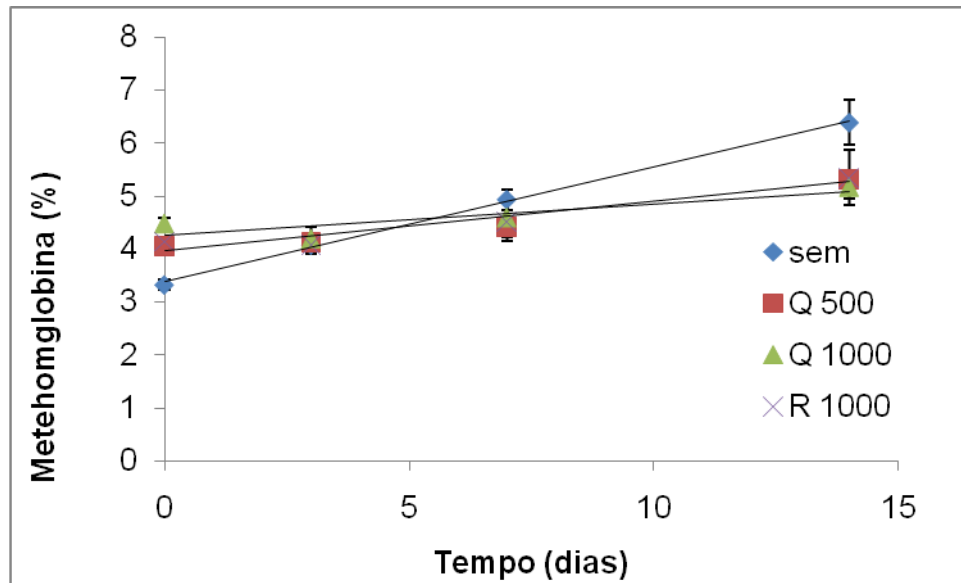


FIGURA 5 – Comportamento da metahemoglobina em função do tempo e da presença da quercetina e da rutina em diferentes concentrações.

4 - DISCUSSÃO

Os eritrócitos são um bom modelo experimental no estudo do metabolismo oxidativo devido a sua fácil obtenção, simplicidade estrutural, e ser altamente vulnerável à lesão oxidativa, com conseqüente formação da metahemoglobina ao longo de seu processo normal de envelhecimento celular. A avaliação do metabolismo oxidativo do eritrócito permite a investigação do efeito protetor de vários compostos, como em nosso estudo, da quercetina e rutina, flavonóides encontrados em vários alimentos. Os flavonóides, juntamente com os antioxidantes endógenos do eritrócito formam um importante sistema de proteção contra a ação dos radicais livres (HAPNER, 2010).

No presente trabalho, procuramos avaliar a atividade antioxidante de dois flavonóides, uma aglicona (quercetina) e um glicosídeo (rutina) que possui um açúcar ligado à estrutura básica dos flavonóides. A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada principalmente pelo número e posição dos grupos hidroxila, que são capazes de doar os átomos de hidrogênio e suportar a deslocalização dos elétrons no anel aromático. Estudos indicam que agliconas têm maior capacidade antioxidante que os flavonóides conjugados (DIAS, 2005; CERQUEIRA, 2007; DORNAS, *et al*, 2007). Esta diferença de atividade poderia ser explicada pela maior hidrofília dos glicosídeos, que dificulta o acesso do antioxidante a fase lipídica (MAGALHÃES, 2009).

As moléculas quercetina e rutina apresentam apenas uma diferença estrutural: a quercetina possui um grupo OH na posição 3, enquanto a rutina tem um glicosídeo de ramnose (rutinose). Esta diferença estrutural pode ser particularmente importante na interação dos flavonóides com os constituintes da membrana e na possível penetração no eritrócito. A rutinose pode dificultar a difusão do flavonóide através da membrana e o conseqüente acesso ao interior do eritrócito. Sugere-se que a quercetina consegue atravessar a membrana plasmática por difusão passiva. A quercetina ao ser retirada do meio extracelular, poderá continuar a proteger os danos oxidativos de proteínas de membrana importantes para a manutenção da estabilidade da membrana, enquanto a rutina poderá deixar de exercer essa proteção (SILVA, 2006)

Na comparação da atividade protetora quanto à formação de metahemoglobina, nossos resultados não demonstraram diferença significativa entre a quercetina e a rutina (tabela 1).

Os valores da dosagem de metahemoglobina nos eritrócitos e seus respectivos desvios padrões com e sem a ação dos flavonóides estão descritos na tabela 1. Utilizando o teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$ para comparar a concentração de metahemoglobina nos diferentes grupos do trabalho, verificou-se diferenças estatisticamente significativas na diminuição na formação de metahemoglobina a partir do sétimo dia de incubação, em todas as concentrações de quercetina e rutina testados, em relação ao grupo sem tratamento.

Silva, *et al.* (2006), induzindo a formação da metahemoglobina pelo cobre, encontrou inibição pela rutina em aproximadamente 30%. Segundo Comar (2003), a quercetina e a rutina foram capazes de prevenir o dano oxidativo em eritrócitos tratados com oxidantes, revelado pelo decréscimo na formação de metahemoglobina. Para Ferrali, *et al.* (1997), a quercetina é considerada um fator importante de proteção contra a peroxidação dos lipídios da membrana, porém neste trabalho a metahemoglobina não foi determinada.

Um fator importante a considerar para justificar as diferenças entre os diversos estudos é a variabilidade biológica dos eritrócitos. A susceptibilidade ao ataque oxidante varia entre doadores, dependendo, por exemplo, das concentrações de antioxidantes não-enzimáticos presentes no eritrócito e também da atividade das enzimas antioxidantes (SILVA, 2006). Outro fator é que, diferentemente dos autores acima citados, neste trabalho não se adicionou nenhuma substância indutora da oxidação, apenas o envelhecimento natural do eritrócito.

O mecanismo exato pelo quais os flavonóides podem inibir a formação da metahemoglobina é difícil de ser totalmente elucidado. Porém, sabe-se que os flavonóides são capazes de quelar metais e seqüestrar radicais livres pela formação de radicais fenoxil, o que poderia explicar em parte, nossos resultados. É importante salientar que, a capacidade antioxidante dos flavonóides é bem conhecida em estudos *in vitro*, porém sua ação *in vivo* nem sempre é comprovada. Neste sentido, nosso trabalho contribui para certificar mais uma frente de ação protetora destes compostos, onde mais estudos se fazem necessários, para total comprovação desta atividade.

Por outro lado, nossos resultados podem ser utilizados como subsídio para futuros estudos, que aprofundem o entendimento da prevenção de casos de metahemoglobinemias adquiridas, principalmente em crianças. Rechetzki (2012) demonstrou que a concentração de metahemoglobina em crianças abaixo de 10 anos é maior que nos adultos, provavelmente por imaturidade do sistema enzimático, o que pode ser um fator de risco adicional para o desenvolvimento das metahemoglobinas adquiridas. Pode-se esperar que se estas crianças forem expostas a substâncias antioxidantes, ocorrerá um aumento ainda maior de metahemoglobina formada. Isso nos leva a pensar que a dieta alimentar das crianças deve necessariamente conter flavonóides, como por exemplo, quercetina e rutina, com comprovados efeitos antioxidantes na prevenção da formação da metahemoglobina.

O presente trabalho abre perspectivas para o estudo da prevenção de casos de metahemoglobinemia adquiridas, principalmente em crianças. Porém, para a comprovação final dos resultados apresentados, estudos mais aprofundados devem ser realizados, utilizando outras concentrações de flavonoides, maior número de amostras, outros mecanismos de estresse oxidativo, além de estabelecer qual a quantidade de alimentos contendo esses flavonóides deveria ser ingerida diariamente, para se obter o efeito protetor sobre a formação de metahemoglobina in vivo.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-DA-SILVA, R.H., MORAES, T.P., MORAES, G. Implications of the oxidative stress on the erythrocyte metabolism of Down Syndrome individuals. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 25, p.231-237, 2003.
- CAI, Q., RAHN, R.O., ZHANG, R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. **Cancer Letters**. 119, p.99-107, 1997.
- CERQUEIRA, F.M., MEDEIROS, M.H.G., AUGUSTO, O. Antioxidantes Dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**. 30, p.441-449, 2007.
- CHAVES, M.A.F. **Ação antioxidante das vitaminas C e E no processo oxidativo em eritrócitos de indivíduos portadores de Hemoglobina S**. Curitiba. 2007. 130p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná.
- COMAR, S.R. **Ação de quercetina, rutina e extrato hidroalcoólico de Vitis vinifera em eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa**. Curitiba. 2003.78p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná.
- DALPINO, D., DILTOR, L.A.M., OPRMOLLA, V.A. Atividade da NADH-redutase de metemoglobina em hemolisado e membranas eritrocitárias de pacientes hansenianos sob tratamento sulfônico. **Hansenologia Internationalis**. 23, p.14-26, 1998.
- DIAS, A.S. **O antioxidante quercetina diminui o estresse oxidativo hepático em ratos diabéticos**. Porto Alegre. 2005. 111p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Setor e Fisiologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- DORNAS, W.C., OLIVEIRA, T.T., RODRIGUES-DAS-DORES, R.G., SANTOS, A.F., NAGEM, T.J. Flavonoids: therapeutic potential against oxidative stress. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 28, p. 241-249, 2007.
- FERRALI, M.; SIGNORINI,C.; CACIOTTI,B.; SUGHERINI,L.; CICCOTI,L.; GIACHETTI,D.; COMPORTI,M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **Febs Lett**, 416,p.123-129, 1997.
- GRINBERG,L.N.; RACHMILEWITZ,E.A.; NEWMAN,H. Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. **Biochem. Pharmacol.**, 48, p. 643-649, 1994.
- HAPNER, C.D., DEUSTER, P., CHEN, Y. Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. **Chemico-Biological Interactions**. 186, p.275-279, 2010.

HU, J.P.; CALOMME, M.; LASURE, A.; DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. & VANDEN BERGHE, D.A. Structure-activity relationships of flavonoids with superoxide scavenging ability. **Biol. Trace. Elem. Res.**, 47, p.327-331, 1995.

JOVANOVIC, S.V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIC, B.; SIMIC, M.G. Flavonoids as antioxidant. **J. Am. Chem. Soc.**, 116, p.4846-4853, 1994.

KRUKOSKI, D.W. **Ação antioxidante de ácido L-ascórbico e desferoxamina em eritrócitos humanos isolados submetidos a sobrecarga oxidativa por terc-butilhidroperóxido**. Curitiba. 2006. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná.

LOPÉZ-REVUELTA, A.; SANCHEZ-GALLEGO, J.I.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, A.; SANCHEZ-YAGUE, J.; LLAINILLO, M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, 161, p.79-92, 2006.

MACHADO, L.P., KOHAYAGAWA, A., SAITO, M.E., SILVEIRA, V.F., YONEZAWA, L.A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. 8, p.84-94, 2009.

MAGALHÃES, A.S.M. **Estudo do efeito protetor da espécie *Cydonia oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos**. Porto. 2009. 72p. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa.

MARTINEZ-FLORES, S.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUNON, J. Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v.17, p.271-278, 2002.

MARTINS, M.A.S.S.G. **O eritrócito como indicador de stress *in vivo*, no exercício físico e nas doenças cardiovasculares**. Portugal. 1995. 191p. Dissertação (Doutoramento em Farmácia, área de especialização em Bioquímica) faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

MOREL, I., LESCOAT, G.; COGREL, P.; SERGENT, O.; PASDELOUP, N.; BRISSOT, P.; CILLARD, P.; CILLARD, J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochem. Pharmacol.**, 45, p.13-19, 1993.

NAOUM, P.C., RADISPIEL, J., MORAES, M.S. Dosagem espectrométrica de metemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 26, p.19-22, 2004.

NASCIMENTO, T.S., PEREIRA, R.O.L., MELLO, H.L.D., COSTA, J. Metemoglobinemia: do Diagnóstico ao Tratamento. **Rev Bras Anesthesiol.** 58, p.651-664, 2008.

PEREIRA, A.L.F., VIDAL, T.F., CONSTANT, P.B.L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr.** 34, p. 231-247, 2009.

Rechetzki KF, Henneberg R, da Silva PH, do Nascimento AJ. Reference values for methemoglobin concentrations in children. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 2012;34(1):14-16.

SANTOS, A.F. **Ação de desferoxamina e deferiprona em eritrócitos de portadores de β -talassemias submetidos à sobrecarga oxidativa de terc-butilhidroperóxido *in vitro*.** Curitiba. 2008. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná.

SILVA, J.N., BEIRÃO, T., FILIPE, P., FERNANDES, A. Efeito de flavonóides no stresse oxidante e foto-oxidante no eritrócito humano. **Boletim da SPM.** 21, p.6-28, 2006.